

**Title**

Fermentative production of amino acids

**Inventor Name**

Nakayama, Kiyoshi; Araki, Kazumi; Tanaka, Yoshitake

**Patent Assignee**

Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Japan

**Publication Source**

Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 4 pp.

**Identifier-CODEN**

JKXXAF

**Patent Information**

PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
JP 52018886	A2	19770212	JP 1975-93181	19750801
<—				
JP 58038153	B4	19830820		

**Priority Application Information**

JP 1975-93181 19750801

**Abstract**

Amino acids except for L-glutamic acid were produced by *Microcycclus*. Thus, *M. evaneus* HS-22 (FERM-P 3138) was cultured with shaking at 30° for 72 h on a medium (pH 7.1) contg. MeOH 20 mL, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.5, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7.5, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1, NaCl 0.1, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.5, and CaCO<sub>3</sub> 30 g/L plus trace amts. of FeSO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, biotin, and phenol red; 2 mL MeOH and 0.2 g urea were added to each dL broth after 24, 32, 48, and 56 h of cultivation. Leucine [61-90-5], isoleucine [73-32-5], valine [72-18-4], alanine [56-41-7], aspartic acid [56-84-8], and lysine [56-87-1] were produced at 0.7, 0.1, 0.7, 0.2, 0.1, and 0.3 mg/mL, resp. These amino acid were purified by ion exchange column chromatog.

**International Patent Classification**

C12D013-06

**Document Type**

Patent

**Language**

Japanese

**Accession Number**

1977:187668 CAPLUS

**Document Number**

86:187668

Our Ref. OP1631-US

Prior Art Reference

Japanese Patent Laid-Open Publication No. Sho 52-18886

Laid-Open Date: February 12, 1977

Patent Application No. Sho 50-93181

Filing Date: August 1, 1975

Title: PROCESS OF PRODUCING AMINO ACID BY A FERMENTATION METHOD

Inventors: Kiyoshi NAKAYAMA, Sagamihara-shi, Kanagawa-ken, Japan,  
Kazumi ARAKI, Machida-shi, Tokyo, Japan, and  
Yoshitake TANAKA, Machida-shi, Tokyo, Japan.

Applicant: KYOWA HAKKO KOGYO KABUSHIKI KAISHA  
(English: Kyowa Fermentation Co., Ltd.)  
Chiyoda-ku, Tokyo, Japan

- - - - -

Translation of Claim (only one claim):

A process of producing amino acid (excluding L-glutamic acid)  
by a fermentation method comprising the steps of:

culturing a strain, which belongs to the genus *Microcycclus* and  
having an ability to produce amino acid (excluding L-glutamic acid),  
in a medium;

allowing the culture to produce and accumulate amino acid  
(excluding L-glutamic acid); and

collecting the produced amino acid.



4 特  
(8000円)

特 許 願 (B)

昭和30年8月1日

特許庁長官 殿

1. 発明の名称

発酵法によるアミノ酸の製造法

2. 発 明 者

住 所 神奈川県横浜市港北区日ノ目6番9号  
氏 名 中山 清 (ほか 3名)

3. 特許出願人

郵便番号 100  
住 所 東京都千代田区大手町一丁目6番1号  
名 称 (102)協和醗酵工業株式会社  
代表者 高 田 弘

4. 添付書類の目録

- (1) 明 細 書  
(2) 願 書 副 本  
(3) 微生物保管委託申請書受理番号照 通



方  
密

明 細 書

1. 発明の名称

発酵法によるアミノ酸の製造法

2. 特許請求の範囲

ミクロサイクラス属に属するアミノ酸(たとし、L-グルタミン酸を除く)生産性菌株を培地に培養し、アミノ酸(たとし、L-グルタミン酸を除く)を生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする発酵法によるアミノ酸(たとし、L-グルタミン酸を除く)の製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、発酵法によるアミノ酸の製造法に関するものである。さらに詳しくは、ミクロサイクラス属に属するアミノ酸(たとし、L-グルタミン酸を除く)生産性菌株を、該菌の資化しうる炭素源(たとえば、メタノールなどのアルコール、グルコース、フラクトース、糊蜜、可溶性デンプンなどの糊質、グリセリンなどの糖アルコール、フマル酸、コハク酸、グルコ

①9 日本国特許庁

# 公開特許公報

①特開昭 52-18886

④3公開日 昭52.(1977) 2.12

②1特願昭 50-93/8/

②2出願日 昭50.(1975) 8.1

審査請求 未請求 (全4頁)

庁内整理番号

7110 49  
7110 49

⑤2日本分類

36(D)D252  
36(D)D251

⑤1 Int.Cl?

C12D 13/06

ン酸などの有機酸など)、窒素源、および無機物ならびにその他の栄養素を相よく含有する培地に接種、培養してアミノ酸(たとし、L-グルタミン酸を除く)を培養液中に生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とするアミノ酸(たとし、L-グルタミン酸を除く)の製造法に関するものである。

リジン、アスパラギン酸、ロイシン、イソロイシン、バリン、アラニン、セリン、ホモセリンなどのアミノ酸は食品、医薬品、飼料などとして広く利用され、その工業的安価な製法が望まれている。

本発明者らは、比較的安価に、大量に供給されるメタノールを主炭素源とするアミノ酸の製法について研究した。その結果、たとえば、ミクロサイクラス・エパネウスATCC 21373(アメリカ特許第3663370)(メタノールよりL-グルタミン酸を生産する菌株)より誘導された変異株(チアリジンとホモセリンの共存下で生育する菌株、チアリジンとスレオニン

の共存下で生育する菌株)の培養物中に、リジン、アスパラギン酸、ロイシン、イソロイシン、バリン、アラニン、セリン、ホモセリンなどのアミノ酸が生成蓄積する事を見出した。

前記マイクロサイクラス属の菌を利用する本発明は、従来、メタノールを主炭素源として、発酵法により、アミノ酸を製造する方法として既知な方法即ち、シュウドモナス属、アクロモバクター属の細菌を利用する方法(特公昭45-25273)、バチルス属、プレバクテリウム属、マイクロコッカス属、サルシナ属の細菌を利用する方法(特開昭48-98092)、プロタミノバクター属の細菌を利用する方法(フランス特許公開2225-517および同2225-520)とは、使用微生物を異にし、さらに、マイクロサイクラス属の菌を利用するL-グルタミン酸の製造法(アメリカ特許第3663370)とは、生産するアミノ酸の種類において区別され、新規な発明である。

以下本発明を詳細に説明する。

培地組成：メタノール20g/l、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  1g/l、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  3g/l、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2g/l、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10mg/l、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{NH}_2\text{O}$  10mg/l、 $\text{CaCl}_2$  10mg/l、チオ尿素50mg/l、ビオチン10mg/l、 $\text{NaCl}$  0.1g/l、寒天20g/l、チアリジン1g/l、ホモセリン2g/l、水で1lとする。(pH7.2)

なお、上記培地において、ホモセリンの代りにスレオニンを用いると、チアリジンとスレオニンの共存下で生育できる変異株を誘導することができる。

上記の如き変異誘導法によつて、マイクロサイクラス属のアミノ酸(ただし、L-グルタミン酸を除く)生産性菌株を得ることができるが、天然界より、上記の如き性質をもつた菌株を得ることもできる。

本発明における培地としては、使用菌の質化しうる炭素源、窒素源、無機物、その他の栄養素を豊よく含有するものであれば合成培地、天

本発明において使用される微生物はマイクロサイクラス属に属するアミノ酸(ただし、L-グルタミン酸を除く)生産性菌株であればいずれでも良い。この様なアミノ酸生産菌株はマイクロサイクラス属に属する細菌に公知の方法で紫外線照射、 $\gamma$ 線照射、薬剤処理などの変異処理を施して公知の適当な選択法を併用することによつて得ることができる。

次に、菌株として、マイクロサイクラス・エバネウス ATCC21373を用いた場合の次にその具体的な操作法について説明する。

菌株(ATCC21373)の懸液(10<sup>8</sup> cells/ml)を調整し、これに、0.01Mリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解したNTG(N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン)を最終濃度0.5mg/mlになるように加え、室温で60分間処理する。ついで該処理液を下記の培地に塗布し、該培地で生育する菌株(チアリジンとホモセリンの共存下で生育する変異株)の中からアミノ酸生産性の高い菌株を選択する。

3字加入

2字削除

然培地のいずれも使用できる。

炭素源としては、主にメタノールが利用されるが、グルコース、フラクトース、糖蜜、可溶性デンプンなどの糖質、グリセリンなどの糖アルコール、フマル酸、コハク酸、グルコン酸などの有機酸なども主炭素源として利用できる。

主炭素源として使用するメタノールは培養初期から高濃度で使用すると微生物の生育を阻害する場合があるので、通常は0.1~3%の低濃度で培養を開始し、その後必要に応じて逐次添加すると好結果を生じ得る。

培地の窒素源としては、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、クエン酸アンモニウムなど、各種無機酸や有機酸のアンモニウム塩、あるいはアンモニア、尿素、アミン類、その他窒素含有化合物、ならびにペプトン、YZアミン、酵母エキス、肉エキス、コーンスープリカー、カゼイン加水分解物、鱈加水分解物、フィッシュミールあるいはその消化物、

脱脂大豆あるいはその消化物などの窒素性有機物質などの種々のものが使用できる。

さらに無機物として硫酸第一カリウム、硫酸第二カリウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガ、硫酸亜鉛、炭酸カルシウムなどを使用する。

もちろん本発明に使用する微生物が生育のために特定の栄養素を必要とする場合はその栄養素を適量培地中に存在せしめなければならない。しかしこの種の栄養素は前記栄養素として例示した窒素性有機物質に含まれて加えられる場合があり、その様な場合には特に添加する必要はない。

培養は振盪あるいは底部通気攪拌などの好気的条件下で行う。培養温度は通常20〜40℃の範囲で、培地のpHは3〜9の範囲、好ましくは中性付近に保持することが望ましいが、これ以外の温度条件あるいはpH条件下でも使用菌が生育すれば実施可能である。培地のpH調節は炭酸カルシウム、pH緩衝剤、あるいは酸ま

試験株を、メタノール20ml、 $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$  2.5g、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  7.5g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1g、 $\text{NaCl}$  0.1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{NH}_2\text{O}$  10mg、 $\text{CaCl}_2$  10mg、ビオチン10μg、フェノールレッド(pH指示薬)10mg、および $\text{CaCO}_3$  30gを1lの蒸留水に溶解した培地(pH7.1)5mlを含む50ml容大型試験管に接種して30℃、72時間振盪培養を行なった。この際、培養開始後24、32、48、56時間目にメタノールをそれぞれ2ml/dl(合計8ml/dl)および尿素を0.2g/dl添加した。この時培養液中に生成したアミノ酸の蓄積量は次の通りである。

蓄積したアミノ酸	蓄積量(mg/ml)
ロイシン	0.7
イソロイシン	0.1
バリン	0.7
アラニン	0.2
アスパラギン酸	0.1
リジン	0.3

たはアルカリ溶液を添加することにより目的を達するが、使用菌株によつてはpH調節を必要としない場合がある。培養期間は通常1〜7日間で培養液中にアミノ酸が生成蓄積する。

培養終了後、菌体や炭酸カルシウムなどの沈澱物を除去し、実施例に示すようなイオン交換樹脂処理により培養物から個々のアミノ酸を回収する。その他公知のイオン交換樹脂処理法、濃縮法、乾燥法などを併用することによつても回収することができる。

次に実施例をあげて本発明を具体的に示す。

#### 実施例1

菌種としてマイクロサイクラス・エバネウス H B - 22 K Y 7 8 3 1 (農工研寄託受託番号第3/38号)を使用した(本菌株はマイクロサイクラス・エバネウス K Y 3 8 3 2 (ATCC 21373)を親株としてチアリジン100/μlおよびホモセリン200/μlの両者を含む培地に生育可能な変異株として取得されたものであつて、親株はこの条件下で全く生育できない。)

培養終了後の培養液500mlから菌体、炭酸カルシウムその他の沈澱物を除き、ろ液を強酸性陽イオン交換樹脂ダイヤイオンBK-1(H<sup>+</sup>型)(三菱化成社製)のカラムに通してロイシンを吸着させ、水洗後0.5規定アンモニア水で溶出してロイシン画分を集め、濃縮してpH5.98の等電点で晶出させることにより純度98%以上のロイシン190mgを得た。

ロイシン以外の他のアミノ酸も、上記の如きイオン交換処理法を適宜応用することによつて精製分離される。

#### 実施例2

菌種としてマイクロサイクラス・エバネウス K Y 3 8 3 2 (ATCC 21373)から誘導されたマイクロサイクラス・エバネウス T B - 19 K Y 7 8 3 2 (農工研寄託受託番号第3/39号)を使用した。本菌株はチアリジン100/μlおよびL-スレオニン200/μlの共存下で生育可能な菌株として取得された変異株であつて、親株はこの条件下で全く生育できない。

この種菌を実施例1の場合と同様に培養し、培養終了後菌体、炭酸カルシウムその他の沈澱物を除き、培養物を濃縮した後1/規定培養液中で120℃、2時間加熱したところ、このサンプル中のアミノ酸としてホモセリン0.44mg/mlおよびセリン0.35mg/ml(培養液中の濃度として)が蓄積した。

#### 実施例2

種菌として実施例1で使用したマイクロサイクルス・エパネウスH8-22 EY7831(微工研寄託受遺番号第3/38号)を使用し、実施例1で使用した培地にさらにコーンステープリカー0.5gを添加した培地(pH7.1)を使用する他は実施例1の場合と同様に培養したところ、培養液中にロイシン0.9mg/ml、イソロイシン0.2mg/ml、バリン1.0mg/ml、アラニン0.4mg/ml、アスパラギン酸0.2mg/ml、およびリジン0.3mg/ml(培地中の各アミノ酸の濃度と差し引いた値)がそれぞれ生成蓄積した。

#### 前記以外の発明者

住 所 東京都町田市山崎町3130番地  
氏 名 アラキ カズキ  
住 所 東京都町田市金井町3133番地  
氏 名 田中 芳 武